

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.20.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 20-0006-08

雷公藤内酯醇抑制 TNF- α 表达对小鼠溃疡性结肠炎的影响 *

张海峰¹, 张彬¹, 周国雄¹, 陈卫昌²

(1. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001; 2. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

摘要: **目的** 了解雷公藤内酯醇 (TL) 对葡聚糖硫酸钠 (DSS) 致溃疡性结肠炎 (UC) 小鼠的疗效, 探索其是否与抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 过表达相关。**方法** 复制 DSS 致 UC 小鼠动物模型, 分为空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组。分别予以 3 种剂量的 TL, 以及美沙拉嗪、地塞米松治疗, 观察小鼠疾病活动指数、结肠组织学评分、结肠病理学评分, 检测 TNF- α 在血清和局部病变组织中的表达变化。**结果** TL 组、地塞米松组、美沙拉嗪组小鼠结肠炎症减轻, TNF- α 表达下调。TL 2、3 组及地塞米松组、美沙拉嗪组分别与生理盐水组、丙二醇组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** TL 对 UC 有治疗作用, 可能是通过抑制 TNF- α 过表达发挥作用, 提示 TL 可能是一种有效的治疗 UC 的方法。

关键词: 溃疡性结肠炎; 肿瘤坏死因子- α ; 雷公藤内酯醇; 治疗; 动物实验

中图分类号: R574.62

文献标识码: A

Effect of inhibition of TNF- α expression by triptolide on experimental ulcerative colitis in mice*

Hai-feng Zhang¹, Bin Zhang¹, Guo-xiong Zhou¹, Wei-chang Chen²

(1. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of triptolide (TL) on ulcerative colitis (UC) and explore the potential association between therapeutic effect of TL and TNF- α expression using dextran sulfate sodium salt (DSS) mouse model. **Methods** The DSS mouse model was established to simulate human UC. Eighty BALB/c female mice were randomly allocated into eight groups with equal number. Group A was blank control group, the mice in group B received normal saline injection, the mice in group C received propylene glycol injection, the mice in group D was injected with Dexamethasone, the mice in group E was fed with water-dissolved Mesalazine through stomach tube at a daily dose of 20-30 mg/kg, and the mice in groups F, G and H were administered with different doses of TL (TL1, TL2 and TL3). Information regarding mice activity, diet and stool property was recorded daily. The mice were sacrificed on day 8, and disease activity index, colon tissue histological score, and colon pathological score were calculated. The serum level of TNF- α was tested by ELISA, and TNF- α expressions in the colonic mucosa specimens were examined by fluorescence quantitative PCR at gene level and by Western blot at protein level. **Results** In the

收稿日期: 2017-11-14

* 基金项目: 江苏省南通市社会发展基金 (No: BK2012074)

[通信作者] 陈卫昌, E-mail: weichangchen@126.com

TL (TL2 and TL3), Mesalazine and Dexamethasone-treated mice, the symptoms of colitis were relieved, TNF- α expression was significantly decreased compared with the normal saline and propylene glycol injection groups ($P < 0.05$). **Conclusions** TNF- α expression is upregulated in UC mouse model and involved in the development and progression of UC. TL can inhibit TNF- α expression, suggesting that TL may be a novel therapeutic drug for the treatment of UC.

Keywords: ulcerative colitis, TNF- α , treatment, triptolide, animal experiment

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 主要促炎因子。研究表明, TNF- α 在 UC 血清、局部组织中的表达明显升高^[1-7]。雷公藤内酯醇 (Triptolide, TL) 是从中药雷公藤中分离的二萜内酯化合物, 具有抗炎、免疫调节作用^[8-17]。本实验应用 TL 治疗 UC 小鼠, 观察治疗前后小鼠的病情变化, 以及 TL 与疾病的相关性, 进一步明确 TL 是否对 UC 有疗效, 以及是否与抑制 TNF- α 的表达有关。

1 材料与方法

1.1 材料

选择 4 ~ 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 80 只, 由南通大学动物实验中心提供, 在南通大学动物实验中心动物房按常规方式喂养。葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) (美国 MP Biomedicals 公司), TL (中国南京泽郎医药科技有限公司), Trizol 抽提 RNA 试剂 (美国 Invitrogen 公司), PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), TNF- α 多克隆抗体 (兔抗小鼠, 美国 Abcam 公司), 二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。本实验已通过南通大学附属医院医学伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的复制 按 STEVCEVA^[18] 和张艳丽等^[19] 的方法复制 DSS 实验动物模型, 除空白对照组外, 其他组小鼠饮用 5% DSS 溶液 (5g DSS 溶于 100 ml 蒸馏水) 7 d。

1.2.2 实验分组 将 80 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组 8 组, 分笼饲养, 每笼 10 只。空白对照组: 不予任何处理; 生理盐水组: DSS 模型复制成功后腹腔注射生理盐水 0.2 ml/次, 1 次/d; 丙二醇组: 腹腔注射 20% 丙二醇 0.2 ml/次, 1 次/d; 地塞米松组: 地塞米松 0.1 mg/(kg·d) 溶于生理盐水中腹腔注射; 美沙拉嗪组: 美沙拉嗪

20 ~ 30 mg/kg 溶于水中经胃管注入, 3 次/d; TL 1 组: TL 溶于 20% 丙二醇, 腹腔注射药量为 0.20 mg/(kg·d); TL 2 组: TL 溶于 20% 丙二醇, 腹腔注射药量为 0.40 mg/(kg·d); TL 3 组: TL 溶于 20% 丙二醇, 腹腔注射药量为 0.60 mg/(kg·d)。

1.2.3 疾病活动指数 (disease activity index, DAI)

评分 各组从第 1 天开始, 每日观察、记录小鼠的一般情况, 包括精神、活动、饮食、体重变化, 同时观察小鼠的大便性状及便血情况, 分析治疗前后结肠病变的变化。参照 MURANO 等^[20] 的标准进行 DAI 评分 (见表 1)。DAI = (体重下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3。大便性状分数分为: ①正常大便, 可成型颗粒样大便; ②松散便, 不与肛门相黏的糊状粪便或半成形不黏肛便; ③稀便, 黏于肛门的水样便。大便隐血检测采用传统联苯胺法。

1.2.4 大体形态学评分

模型复制成功后第 8 天, 采用颈椎脱臼法处死各组小鼠, 分离整段结肠组织并纵行剖开结肠, 预冷生理盐水冲洗清洁数次, 用滤纸滤干, 大头针展开平铺, 固定结肠组织。用肉眼观察结肠黏膜炎症及溃疡发生情况, 参照 EKSTROM 等^[21] 的标准进行评分: 黏膜无损害计 0 分, 黏膜充血计 1 分, 溃疡面积 <25% 受损面积计 2 分, 溃疡面积占 25% ~ 50% 受损面积计 3 分, 溃疡面积 >50% 受损面积计 4 分。将病变明显肠段分为 3 部分: 一部分用 4% 甲醛固定, 送病理科, 行苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色; 一部分于 -80℃

表 1 DAI 评分标准

评分	体重下降	大便性状	便血
0 分	无	正常	(-)
1 分	1%~5%	介于两者之间	介于两者之间
2 分	>5%~10%	松散	隐血 (+)
3 分	>10%~15%	介于两者之间	介于两者之间
4 分	>15%	稀便	肉眼血便

条件下保存,留做逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR);另一部分提取蛋白,留做 Western blot 检测。

1.2.5 结肠病理组织学观察及评分 取病变组织常规石蜡包埋、切片、HE 染色,参照 BOIRIVANT 等^[22]的标准行盲法评分,由 2 位病理科医师分别双盲阅片,结果取均值进行评分。组织学评分标准:正常计 0 分;极低白细胞浸润、<10% 高倍视野 (high power field, HPF) 计 1 分;少量白细胞浸润、10% ~ 25% HPF 计 2 分;中量白细胞浸润、25% ~ 50% HPF,同时伴血管密集和肠壁增厚计 3 分;大量白细胞浸润、>50% HPF、血管高度密集、隐窝变形、扭曲计 4 分。

1.2.6 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 收集血液,3 000 r/min 离心 10 min,将血清与红细胞分离;3 000 r/min 离心 30 min 取上清,3 000 r/min 离心 10 min 去除颗粒和聚合物。操作步骤:在室温下平衡 20 min 后从铝箔袋中取出所需板条,设置标准品孔和样本孔,标准品孔加入不同浓度的标准品 50 μ l/孔;样本孔先加待测样本 10 μ l,再加样本稀释液 40 μ l;空白孔不加。除空白孔外,标准品孔和样本孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μ l/孔,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅或恒温箱温育 60 min。弃液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ l,37℃避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μ l,15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。结果判断:绘制标准曲线,在 Excel 工作表中,以标准品浓度作横坐标,对应 OD 值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值。

1.2.7 RT-PCR 取适量病变组织提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,行 PCR 扩增。TNF- α 正向引物:5' -CCTCAGGAACGGGACTCGAA-3',反向引物:5' -ATGTACACCAAGTCGGTAGCACCA-3',扩增片段长度 86 bp;内参照 β -actin 正向引物:5' -GAGACCTTCAACACCCAGC-3',反向引物:5' -CCACAGGATTCCATACCCAA-3',扩增片段长度 446 bp。PCR 反应条件:95℃预变性 2 min,95℃变性 15 s,58℃退火 25 s,72℃延伸 35 s,共循环 45 次,于每个循环的 72℃时采集荧光数值。为检测每个反应的特异性,循环结束后分析熔解曲线,分析条件为 95℃、15 s,60℃、60 s,95℃、15 s。为消除样本、

逆转录和 PCR 反应的差异,以目的基因 TNF- α 和 β -actin mRNA 含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标。

1.2.8 Western blot 检测 提取总蛋白,用紫外分光光度法测定总蛋白浓度,行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白上样量 20 μ l/孔。在垂直电泳槽中电泳后转膜至硝酸纤维素膜上,5% TBST 封闭 4 h,加入稀释的 TNF- α 一抗 (工作浓度 1 : 2 500) 4℃孵育过夜;TBST 洗膜 10 min/次,共 5 次,加入稀释的二抗 (工作浓度 1 : 5 000) 孵育 2 h,用增强化学发光荧光试剂显影。以 β -actin (47 kDa) 为内参照,用凝胶成像分析系统处理数据,以 TNF- α (17 kDa) 与内参照的灰度比值作为蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用重复测量设计的方差分析或单因素方差分析,组间两两比较用 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物观察

各组小鼠从开始处理后 7 d 内每天固定时间评估各组小鼠 DAI 评分,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间的 DAI 评分有差别 ($F = 37.841$, $P = 0.000$);②各组 DAI 评分有差别 ($F = 55.512$, $P = 0.000$);③各组 DAI 评分变化趋势有差别 ($F = 29.662$, $P = 0.000$)。空白对照组小鼠精神状态、活动、饮食等一般情况良好,大便性状正常,体重逐步增加。生理盐水组、丙二醇组小鼠模型复制成功后第 1、2 天开始饮食减少、活动能力下降,毛色无光泽、体重减少,同时排便次数逐渐增多,大便性状发生改变 (软便、稀糊状、水样便等);第 3、4 天大便隐血或出现暗红色、鲜红色血便。进一步两两比较经 LSD- t 检验,生理盐水组、丙二醇组小鼠 DAI 评分与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($t = 22.368$ 和 24.526 , 均 $P = 0.000$)。TL 2、3 组,以及地塞米松组、美沙拉嗪组在复制模型的同时给予相应治疗后,各组小鼠精神状态好转,活力明显增加,饮食及体重较生理盐水组、丙二醇组下降幅度减少,毛色有改善,便血或大便隐血情况明显好转,部分大便形态逐渐恢复为软便或者固体便;TL 2、3 组,以及地塞米松组、美沙拉嗪组小鼠 DAI 评分与生理盐水组比较,差异

有统计学意义 ($t=9.226$ 、 8.880 、 7.582 和 8.006 , 均 $P=0.000$); TL 2、3 组, 以及地塞米松组、美沙拉嗪组小鼠 DAI 评分与丙二醇组比较, 差异有统计学意义 ($t=11.228$ 、 10.663 、 10.002 和 9.445 , 均 $P=0.000$)。结果显示, TL 与地塞米松、美沙拉嗪有类似效应, 能改善 UC 小鼠的一般情况。见表 2。

2.2 各组小鼠结肠大体形态学评分比较

空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组小鼠结肠大体形态学评分分别为 (0.300 ± 0.100)、(3.206 ± 0.306)、(3.022 ± 0.282)、(1.826 ± 0.168)、(1.968 ± 0.204)、(2.632 ± 0.282)、(2.202 ± 0.228) 和 (2.060 ± 0.202) 分, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=30.360$, $P=0.000$)。空白对照组大部分小鼠结肠黏膜无充血、糜烂及溃疡, 少部分结肠黏膜见少许散在充血。生理盐水组、丙二醇组小鼠直肠及近肛侧结肠黏膜弥漫性充血、水肿, 伴多发性糜烂、浅表溃疡, 部分溃疡表面有坏死组织; 近口侧结肠充血水肿、散在糜烂,

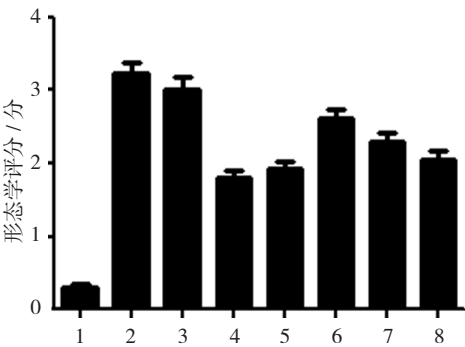
无明显溃疡形成。地塞米松、美沙拉嗪治疗组, 以及 TL 2、3 组小鼠近肛侧结肠黏膜轻、中度充血, 水肿, 糜烂形成较生理盐水组、丙二醇组明显减少, 部分散在浅溃疡; 近口端结肠病变不明显。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 空白对照组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠大体形态学评分比较, 差异有统计学意义 ($t=25.532$ 和 25.731 , 均 $P=0.000$); TL 2 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠大体形态学评分比较, 差异有统计学意义 ($t=7.442$ 和 6.396 , 均 $P=0.000$); TL 3 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠大体形态学评分比较, 差异有统计学意义 ($t=8.840$ 和 7.844 , 均 $P=0.000$)。TL 能减轻 UC 小鼠结肠炎症。见图 1。

2.3 各组小鼠结肠病理组织评分比较

空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组小鼠结肠病理组织评分分别为 (0.750 ± 0.100)、(3.562 ± 0.326)、(3.488 ± 0.302)、(1.666 ± 0.192)、(1.802 ± 0.224)、(2.808 ± 0.282)、(2.020 ± 0.222) 和 (1.862 ± 0.206) 分,

表 2 各组小鼠不同时间 DAI 评分比较 ($n=10$, 分, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
空白对照组	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
生理盐水组	0.292 ± 0.213	0.417 ± 0.154	1.083 ± 0.661	2.167 ± 0.563	3.000 ± 0.642	3.750 ± 0.345	4.002 ± 0.560
丙二醇组	0.333 ± 0.000	0.333 ± 0.000	1.000 ± 0.356	2.292 ± 0.602	2.917 ± 0.345	3.708 ± 0.452	4.120 ± 0.602
地塞米松组	0.292 ± 0.118	0.292 ± 0.118	0.500 ± 0.436	0.917 ± 0.556	1.617 ± 0.427	2.083 ± 0.345	2.475 ± 0.330
美沙拉嗪组	0.292 ± 0.118	0.302 ± 0.120	0.625 ± 0.336	1.017 ± 0.502	1.717 ± 0.489	2.223 ± 0.405	2.575 ± 0.410
TL 1 组	0.250 ± 0.236	0.333 ± 0.178	0.708 ± 0.415	1.542 ± 0.469	2.417 ± 0.345	3.375 ± 0.415	3.875 ± 0.173
TL 2 组	0.250 ± 0.154	0.333 ± 0.178	0.416 ± 0.345	1.325 ± 0.575	1.708 ± 0.603	2.308 ± 0.547	2.917 ± 0.345
TL 3 组	0.333 ± 0.000	0.333 ± 0.000	0.483 ± 0.167	1.417 ± 0.569	1.867 ± 0.793	2.217 ± 0.631	2.767 ± 0.272



1: 空白对照组; 2: 生理盐水组; 3: 丙二醇组; 4: 地塞米松组; 5: 美沙拉嗪组; 6: TL 1 组; 7: TL 2 组; 8: TL 3 组

图 1 各组小鼠结肠大体形态学评分比较 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=22.358$, $P=0.000$)。HE 染色结果显示, 空白对照组小鼠结肠上皮结构、腺体结构完整无破坏, 黏膜无糜烂及溃疡形成, 部分黏膜下层可见少量中性粒细胞浸润; 生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠黏膜上皮结构破损, 见糜烂及溃疡形成, 黏膜及黏膜下层可见大量的淋巴细胞和单核细胞、少量中性粒细胞浸润, 固有层腺体变形、排列紊乱, 部分破坏; 地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 2、3 组小鼠结肠黏膜可见数量不等淋巴细胞和单核细胞浸润, 糜烂及溃疡程度较生理盐水组、丙二醇组减轻。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 空白对

照组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠病理组织评分比较, 差异有统计学意义 ($t=23.325$ 和 24.344 , 均 $P=0.000$); TL 2 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠病理组织评分比较, 差异有统计学意义 ($t=11.058$ 和 11.078 , 均 $P=0.000$); TL 3 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠结肠病理组织评分比较, 差异有统计学意义 ($t=12.469$ 和 12.581 , 均 $P=0.000$)。TL 具有减轻 UC 小鼠结肠局部病变损害的作用。见图 2。

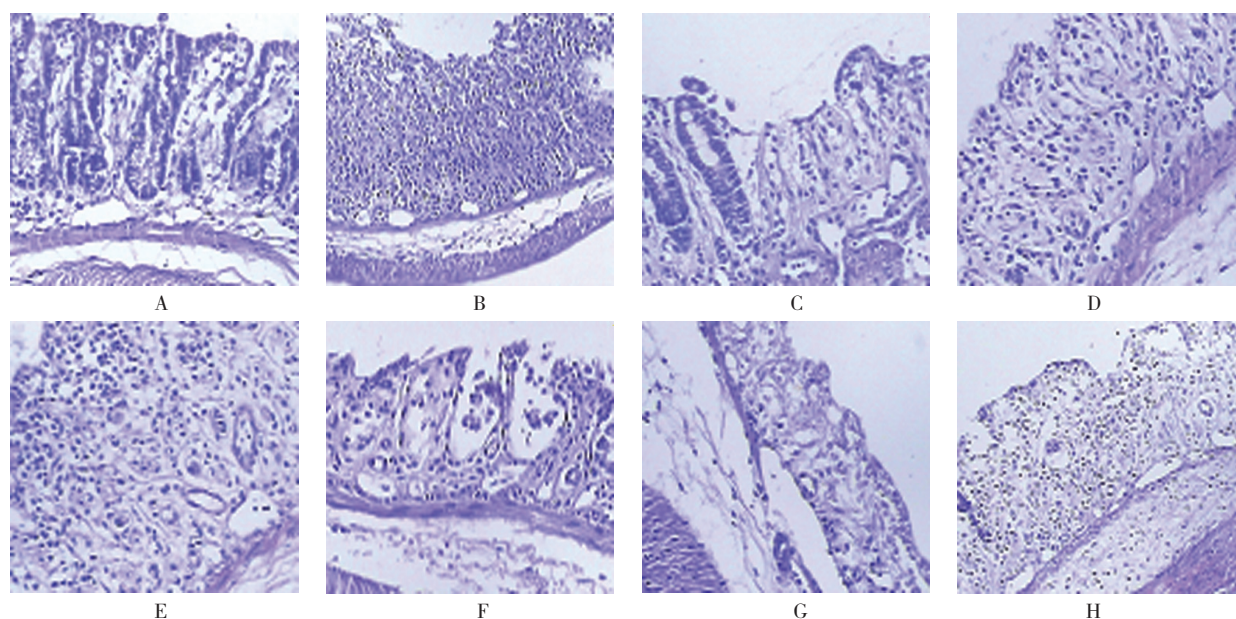
2.4 各组小鼠血清 TNF- α 浓度比较

空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组小鼠血清 TNF- α 浓度分别为 (173.332 ± 18.288)、(388.302 ± 30.202)、(341.322 ± 31.202)、(195.620 ± 18.208)、(231.408 ± 22.608)、(338.36 ± 18.931)、(243.526 ± 23.462) 和 (197.066 ± 20.108) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=80.681$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 空白对照组与生理盐水组、丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度比较, 差异有统计学意义 ($t=17.221$ 和 13.138 , 均 $P=0.000$), 生理盐水组和丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度较高; TL 2 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度比较, 差异有统计学意义 ($t=10.707$ 和 7.086 , 均 $P=0.000$), TL 2 组小鼠血清 TNF- α 浓度较低; TL 3 组与生理盐水组、

丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度比较, 差异有统计学意义 ($t=14.908$ 和 10.992 , 均 $P=0.000$), TL 3 组小鼠血清 TNF- α 浓度较低; 地塞米松组与生理盐水组、丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度比较, 差异有统计学意义 ($t=15.454$ 和 11.408 , 均 $P=0.000$), 地塞米松组小鼠血清 TNF- α 浓度较低; 美沙拉嗪组与生理盐水组、丙二醇组小鼠血清 TNF- α 浓度比较, 差异有统计学意义 ($t=11.763$ 和 8.068 , 均 $P=0.000$), 美沙拉嗪组小鼠血清 TNF- α 浓度较低。TL 能降低 UC 小鼠血清 TNF- α 浓度。

2.5 各组小鼠 TNF- α mRNA 表达水平比较

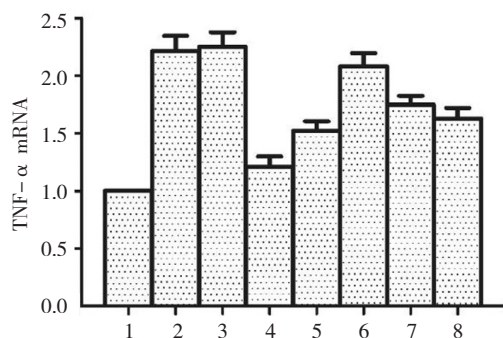
空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组小鼠 TNF- α mRNA 相对表达量分别为 (1.000 ± 0.000)、(2.332 ± 0.366)、(2.422 ± 0.342)、(1.228 ± 0.142)、(1.426 ± 0.150)、(2.022 ± 0.320)、(1.602 ± 0.202) 和 (1.582 ± 0.182), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=19.500$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 空白对照组与生理盐水组、丙二醇组小鼠 TNF- α mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t=10.294$ 和 11.760 , 均 $P=0.000$), 空白对照组 TNF- α mRNA 微弱表达, 生理盐水组和丙二醇组 TNF- α mRNA 表达上调; TL 2 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠 TNF- α mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义



A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 丙二醇组; D: 地塞米松组; E: 美沙拉嗪组; F: TL 1 组; G: TL 2 组; H: TL 3 组

图 2 各组小鼠病理组织学图片 (HE 染色 $\times 200$)

($t=4.939$ 和 5.839 , 均 $P=0.000$), TL 2 组较低; TL 3 组与生理盐水组、丙二醇组小鼠 TNF- α mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t=5.190$ 和 6.133 , 均 $P=0.000$), TL 3 组较低。TL 可抑制 UC 小鼠局部组织中 TNF- α mRNA 过表达。见图 3。

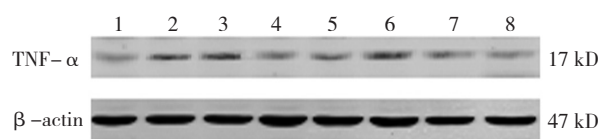


1: 空白对照组; 2: 生理盐水组; 3: 丙二醇组; 4: 地塞米松组; 5: 美沙拉嗪组; 6: TL 1 组; 7: TL 2 组; 8: TL 3 组

图 3 各组小鼠 TNF- α mRNA 表达水平比较
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

2.6 各组小鼠 TNF- α 蛋白表达水平比较

空白对照组、生理盐水组、丙二醇组、地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 1、2、3 组小鼠 TNF- α 蛋白相对表达量分别为 (0.020 ± 0.010)、(0.063 ± 0.020)、(0.058 ± 0.018)、(0.028 ± 0.013)、(0.029 ± 0.013)、(0.046 ± 0.018)、(0.032 ± 0.015) 和 (0.030 ± 0.014), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=57.301$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 生理盐水组、丙二醇组与空白对照组小鼠 TNF- α 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t=5.439$ 和 5.220 , 均 $P=0.000$), 空白对照组小鼠 TNF- α 蛋白微弱表达, 生理盐水组、丙二醇组 TNF- α 表达上调; 地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 2、3 组与生理盐水组小鼠 TNF- α 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t=4.150$ 、 4.032 、 3.507 和 3.823 , $P=0.004$ 、 0.002 、 0.001 和 0.001), 地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 2、3 组 TNF- α 蛋白表达水平较生理盐水组降低; 地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 2、3 组与丙二醇组小鼠 TNF- α 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($t=3.822$ 、 3.694 、 3.139 和 3.473 , $P=0.002$ 、 0.002 、 0.007 和 0.004), 地塞米松组、美沙拉嗪组, 以及 TL 2、3 组 TNF- α 蛋白表达水平较丙二醇组降低。TL 可抑制 UC 小鼠局部组织中 TNF- α 蛋白的合成。见图 4。



1: 空白对照组; 2: 生理盐水组; 3: 丙二醇组; 4: 地塞米松组; 5: 美沙拉嗪组; 6: TL 1 组; 7: TL 2 组; 8: TL 3 组

图 4 各组小鼠 TNF- α 蛋白的表达

3 讨论

TL 具有广泛的免疫调节作用, 但由于作用机制的广泛性及机体免疫系统的复杂性, 其免疫调节机制并不十分清楚。就目前研究结果可知, 其作用机制主要有抑制 T 细胞增殖或诱导 T 细胞凋亡、影响 NF- κ B 活性、抑制肿瘤血管生成、抗氧化和抗脂质氧化等^[8-17]。

张霞等^[16]研究表明, TL 可以抑制 MOG35-55 特异性 T 细胞增殖, 抑制炎症细胞因子 IL-17、IFN- γ 、TNF- α 的表达, 并增加 IL-4、TGF- β 的表达水平, 同时抑制 Nave T 细胞向致病性 Th1 和 Th17 细胞的分化。兰雷等^[17]研究表明, 用 TL 对三硝基苯磺酸/乙醇性结肠炎的大鼠模型进行处理, 发现 TL 可减轻该模型的组织学损伤, 下调促炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 及黏附因子 ICAM-1 的表达水平; 同时检测相应的 NF- κ B 活性发现, 治疗组较模型组明显受抑, 提示 TL 能抑制 NF- κ B 活化, 从而使 NF- κ B 调控的炎症介质产生减少, 大鼠结肠组织损伤减轻。周望等^[23]在复制 UC 大鼠模型的基础上, 以雷公藤红素进行干预, 发现高、低剂量雷公藤红素均能改善结肠组织大体和组织学评分, 降低 NF- κ B、p65, 以及 TNF- α 和 TNF- α mRNA 的表达, 表明雷公藤红素对 TNBS 诱导的大鼠 UC 具有保护作用。TAO 等^[24]研究表明, TL 可抑制结肠上皮肌纤维母细胞内 IL-8、MCP-1、MMP-3 的表达而发挥抗炎效应, 其作用机制主要是抑制 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 激活。TAO 等^[25]另一项研究结果表明, TL 可以减少 TNBS 诱导的 UC 模型小鼠结肠细胞外基质的沉积, 以及减少胶原蛋白的产生, 从而抑制结肠纤维化病变程度。YU 等^[26]研究显示, TL 可明显改善实验小鼠结肠炎症状, 作用机制可能是抑制 TLRs/NF- κ B 信号通路, 认为 TL 可作为 Crohn's 病的治疗方法之一, 值得深入研究。LI 等^[27]研究表明, TL 可以通过下调 IL-6/STAT3/SOCS3 信号通路抑

制 IL-17 表达；组织学检查结果显示，C3H/HeJBir. IL-10 缺失小鼠实验结肠炎症状明显改善。WEI 等^[28-29]研究表明，给予 TL 可以明显减轻 IL-10 缺失小鼠结肠炎的炎症程度和免疫功能紊乱，其机制可能是抑制 IL-6/STAT3、TNF- α /TNFR2 信号通路，认为 TL 可能适用于 Crohn's 病的维持治疗。本实验前期研究结果表明，分别通过 TL、地塞米松治疗 DSS 诱导的 UC 小鼠，发现 TL 能减轻小鼠临床症状，并下调次级淋巴组织趋化因子的表达，提示 TL 可通过抑制 SLC 的过表达，而达到治疗 UC 的目的^[30]。

本研究结果验证，TNF- α 在 UC 的发生、发展中发挥重要作用，抑制其过表达 UC 有治疗作用。同时发现 TL 2、3 组在给予 TL 治疗后，各组小鼠体重增加，一般情况好转，DAI 评分、大体形态观察及评分、病理组织观察及评分均提示小鼠结肠炎症状缓解，结肠组织局部溃疡、糜烂好转，结果提示 TL 对 UC 有治疗作用，其疗效不低于有地塞米松、美沙拉嗪。同时发现给予 TL 治疗后，血清 TNF- α 浓度下降，局部结肠组织中 TNF- α 在 mRNA 和蛋白水平表达均下调，提示 TL 有抑制 TNF- α 过表达的作用。笔者认为 TL 具有抑制炎症的作用，对 UC 有治疗作用，可通过抑制 TNF- α 的过表达而发挥疗效，但其具体作用机制仍不明确。进一步明确 TL 在 UC 中的作用机制，将对 UC 的治疗，特别是对激素、美沙拉嗪类药物疗效欠佳的 UC 患者带来新希望。

综上所述，TL 对 UC 有治疗作用，可能是通过抑制 TNF- α 的过表达而发挥作用，提示 TL 可能是一种有效的治疗 UC 的方法。

参 考 文 献:

- [1] ZIMMERMAN N P, VONGSA R A, WENDT M K, et al. Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm, Bowel Dis*, 2014: 1000-1011.
- [2] FORLAND D T, JOHNSON E, SAETRE L, et al. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *agaricus blazei murill* on expression of cytokines and calprotectin in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Scand J Immunol*, 2011, 73: 66-75.
- [3] PEDERSEN J, COSKUM M, SOEN DERGAARD C, et al. Inflammatory path ways of importance for management of inflammatory bowel disease[J]. *Wold J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 64-77.
- [4] HUR S J, KANG S H, JUNG H S, et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease[J]. *Nutrition Research*, 2012, 32: 801-816.
- [5] BLUMBERG R, CHO J, LEWIS J, et al. Inflammatory bowel disease: an update on fundamental biology and clinical management[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1701-1703.
- [6] ROBERTS-THOMSON I C, FON J, UYLAKI W, et al. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(6): 703-716.
- [7] STROBER W, FUSS I J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1756-1767.
- [8] ZHENG Y, ZHANG W J, WANG X M. Triptolide with potential medicinal value for diseases of the central nervous system[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(2): 76-82.
- [9] LIU Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3): 377-383.
- [10] WANG C Y, BAI X Y, WANG C H. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(3): 543-559.
- [11] WANG X, ZHANG L, DUAN W, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide by inhibiting the NF- κ B signalling pathway in LPS-induced acute lung injury in a murine model[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 447-452.
- [12] DING X, ZHANG B, PEI Q, et al. Triptolide induces apoptotic cell death of human cholangiocarcinoma cells through inhibition of myeloid cell leukemia-1[J]. *BMC Cancer*, 2014, 17(14): 271.
- [13] WEI D, HUANG Z. Anti-inflammatory effects of triptolide in LPS-induced acute lung injury in mice[J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 1307-1316.
- [14] MUJUMDAR N, BANERJEE S, CHEN Z, et al. Triptolide activates unfolded protein response leading to chronic ER stress in pancreatic cancer cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(11): 1011-1020.
- [15] 刘福和, 叶晓莉, 宋倩倩, 等. 雷公藤内酯醇抗肿瘤信号转导机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(4): 727-730.
- [16] 张霞, 胡晓娟, 陈鸣, 等. 雷公藤内酯醇对自身反应性 T 细胞的作用机制研究 [J]. *现代免疫学*, 2011, 31(3): 213-218.
- [17] 兰雷, 陈垦, 王念林, 等. 雷公藤内酯醇对大鼠实验性结肠炎核因子 - κ B 活性的影响 [J]. *中华消化杂志*, 2005, 25: 45-46.
- [18] STEVCEVA L, PAVLI P, HUSBAND A J, et al. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it[J]. *BMC Clin Pathol*, 2001, 1: 3.
- [19] 张艳丽, 黄循铷, 王承党. 小鼠葡聚糖硫酸钠急性溃疡性结肠炎模型的建立和评价 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2006, 15(2): 130-133.
- [20] MURNO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS) -induced colitis[J]. *Clinical Experimental Immunology*, 2000, 120: 51-58.
- [21] EKSTROM G M. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporine A, and 5-aminosalicylic acid[J].

- Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1998, 33: 174-179.
- [22] BOIRIVANT M, FUSS I J, FERRONI L, et al. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis[J]. The Journal of Immunology, 2001, 166: 3522-3523.
- [23] 周璫, 吴叔明, 陈晓宇, 等. 雷公藤红素对三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的保护作用[J]. 胃肠病学, 2007, 12: 144-147.
- [24] TAO Q S, REN J A, LI J S. Triptolide suppresses IL-1 β -induced chemokine and stromelysin-1 gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(1): 81-88.
- [25] TAO Q S, WANG B C, ZHENG Y, et al. Triptolide ameliorates colonic fibrosis in an experimental rat model[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12: 1891-1897.
- [26] YU C, SHAN T, FENG A, et al. Triptolide ameliorates Crohn's colitis is associated with inhibition of TLRs/NF- κ B signaling pathway[J]. Fitoterapia, 2011, 82(4): 709-715.
- [27] LI Y, TIAN Y, ZHU W M, et al. Triptolide induces suppressor of cytokine signaling-3 expression and promotes lamina propria mononuclear cells apoptosis in Crohn's colitis[J]. International Immunopharmacology, 2013, 16: 268-274.
- [28] WEI X W, GONG J F, ZHU J, et al. The suppressive effect of triptolide on chronic colitis and TNF- α /TNFR2 signal pathway in interleukin-10 deficient mice[J]. Clinical Immunology, 2008, 129: 211-218.
- [29] WEI X, GONG J, ZHU J, et al. Therapeutic effects of triptolide on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 20, (8): 1808-1812.
- [30] ZHANG H F, ZHANG X, DING X L, et al. Effect of secondary lymphoid tissue chemokine suppression on experimental ulcerative colitis in mice[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(2): 3337-3345

(童颖丹 编辑)